

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-245414

(43)公開日 平成8年(1996)9月24日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 38/00	ADU		A 61 K 37/02	ADU
	AAM		35/12	ACV
	ABD	8517-4H	C 07 K 14/52	
	ABF		C 12 P 21/00	K
	ABG		A 61 K 37/02	AAM
			審査請求 未請求 請求項の数26 OL (全14頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-183141

(22)出願日 平成7年(1995)7月19日

(31)優先権主張番号 08/379, 960

(32)優先日 1995年1月27日

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 08/487, 122

(32)優先日 1995年6月7日

(33)優先権主張国 米国(US)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71)出願人 595103946

プライベイト バイオロジカルズ コーポ
レイション

Private Biologicals
Corporation

アメリカ合衆国 ジョージア 30326, ア
トランタ, スイート 811, ピーチツリー
ロード エヌ. イー. 3400

(72)発明者 トーマス エム. ロジャース, ジュニア
アメリカ合衆国 ジョージア 30327, ア
トランタ, エヌ. ダブリュー., ウエスト
ウェスレイ ロード 1466

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 IL-6関連疾患の治療用組成物および方法

(57)【要約】

【課題】 サイトカインレベルの上昇に関連した障害の治療用組成物および治療方法、およびIL-6レベルの上昇に関連した障害の治療用組成物および治療方法を提供すること。

【解決手段】 IL-6の上昇により特徴づけられる障害を治療するための組成物であって、薬学的に受容可能なキャリアにおいて、IL-6レベルを減少させるに有効な量の組成物を含み、ここで、該組成物が、形質転換B細胞が免疫モジュレーターを分泌する滅菌培養培地またはIL-6阻害活性を有するその精製画分からなる組成物、およびその製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被験体への投与のための、造血細胞からサイトカイン含有組成物を調製する方法であって、該方法は、以下の工程を包含する、方法：

- 新鮮培地上で該細胞を培養する工程；
- 該細胞培養上清を、該上清の濾過がない状態で採取する工程；および
- 該上清を投与まで維持する工程、ここで、該維持上清は、投与用サイトカイン含有組成物である。

【請求項2】 前記培養工程が、前記細胞によるサイトカインの産生の活性化をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記培養細胞が、免疫刺激細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記培養細胞が癌関連ウイルスに予め曝されている、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記ウイルスがエプスタインバーウィルスである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記上清が、約-40℃以下の温度に急速冷凍することにより維持される、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記冷凍上清が、約3カ月未満維持される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記上清が維持される間凍結乾燥されない、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記上清が緩衝液のない状態で維持される、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 前記培地がヒト血清アルブミンである、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 前記細胞が1gM分泌細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 前記細胞がRPMI1788と称される細胞株であり、受託番号CLL166でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されている、請求項1に記載の方法。

【請求項13】 請求項1に記載の方法により製造された、サイトカイン含有組成物。

【請求項14】 請求項5に記載の方法により製造された、サイトカイン含有組成物。

【請求項15】 IL-6の上昇により特徴づけられる障害を治療するための組成物であって、薬学的に受容可能なキャリアにおいて、IL-6レベルを減少させるに有効な量の組成物を含み、ここで、該組成物が、形質転換B細胞が免疫モジュレーターを分泌する滅菌培養培地またはIL-6阻害活性を有するその精製画分からなる、組成物。

【請求項16】 投薬量が、1日2回与えられる50mLの培養培地より少ない量に相当する、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】 前記障害が、IL-6レベルの上昇に

より特徴づけられる癌である、請求項15に記載の組成物。

【請求項18】 前記障害が、自己免疫障害である、請求項15に記載の組成物。

【請求項19】 前記障害が、化学療法剤での治療に起因する症状である、請求項15に記載の組成物。

【請求項20】 前記障害が、癌または自己免疫障害と関連する痛みである、請求項15に記載の組成物。

【請求項21】 請求項15に記載の組成物であって、前記障害が、多発性骨髄腫(mM)；前立腺癌；卵巣癌；キャッスルマン病；カボージ肉腫(KS)；単一クローニ性高ガンマグロブリン血症；メサンギウム増殖性糸球体腎炎；慢性関節リウマチおよび他の関節炎(RA)；全身性紅斑性狼瘡(SLE)；多発性硬化症(MS)；重症筋無力症(MG)；ギヤンーバレー症候群(GBS)；トキシックショック症候群；細菌性およびウイルス性髄膜炎；HTLV-1-関連脊髄症(HAM)；アルツハイマー病；骨粗鬆症(破骨細胞疾患)；心臓性粘液腫および高カルシウム血症；アレルギー；分類不能型免疫不全；神経性食欲不振；炎症性腸疾患；臨界疾患多発神経性筋障害；急性腎孟腎炎；自己免疫肝炎；大細胞型リンパ腫；肺胞エキノコックス症；子宮内膜症；アテローム性動脈硬化症；乾癬；ヒトパルボウイルス感染；腎細胞癌；子宮前症；胆管癌；HIV；聴神経腫瘍；毛様細胞性白血病；壞死性腸炎；潰瘍性大腸炎；気管支肺形成不全；精神分裂病および情動障害；網膜芽腫；脳下垂体腫瘍；急性腎孟腎炎；甲状腺癌；傍神経節腫瘍；カンジダアルビカヌス感染；巨細胞性動脈炎；乾癬；黒色腫；慢性脾臓炎；手根管症候群；間質性膀胱炎；神経膠星状細胞腫；呼吸性合胞体ウイルス感染；肝臓移植；アメニンジオマス；胃癌；類肉腫症；子宮癌；肺大細胞癌；ヘルコバクターピロリ感染；腺管胸部癌；巨細胞性動脈炎の肉芽腫；結腸直腸癌；臨床的絨毛羊膜炎；非ホジキンリンパ腫；甲状腺中毒症；骨肉腫；悪性中皮腫；腸チフス；IgA腎症；急性脾炎；ファンコニ貧血；腫瘍随伴性血小板増加症；および囊胞性纖維症を含む、組成物。

【請求項22】 前記細胞株が、エプスタインバーウィルスまたはその一部での感染により形質転換される、請求項15に記載の組成物。

【請求項23】 前記細胞株が、受託番号CLL156でアメリカンタイプセルカルチャラーに寄託されたRPMI1788である、請求項15に記載の組成物。

【請求項24】 前記細胞培養培地が、ヒト血清である、請求項15に記載の組成物。

【請求項25】 前記細胞培養培地が、ヒトアルブミンである、請求項15に記載の組成物。

【請求項26】 前記組成物が、分子量およびイオン交換クロマトグラフィーに基づいて精製される、請求項15に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、IL-6レベルの上昇により特徴づけられる種々の障害の治疗方法および治療用組成物に関し、そして形質転換B細胞株由来の物質に基づく。

【0002】

【従来の技術】本願は、「重症筋無力症の治疗方法」と題された1995年1月27日出願の米国出願番号第08/379, 960号、およびThomas M. Rodgers Jr. およびT. Ronald Theodoreによる「癌および自己免疫疾患の治療用組成物および治疗方法」と題された1993年7月9日出願の米国出願番号第08/089, 751号の一部係属出願である。

【0003】1970年代初頭から、新規の癌治療が、リンホカインおよびリンホカイン活性の修飾因子に基づいて開発されてきた。初期の研究者たちは、細胞上清のサイズ濾過画分のテストを開始し、そして特定のサイトカインが、腫瘍活性に影響を及ぼす能力および造血系に作用する能力を有していることを見出した。それは、例えば、McDaniel, M.C. ら、*Clin. Immunol. Immunopathol.*、91104頁 (1976)；およびPapermaster, B.W. ら、*Clin. Immunol. Immunopathol.*、5:48~59 (1976) により報告されている。用いた方法には、サイズ濾過だけでなく、凍結乾燥、クロマトグラフィー分離、および種々の緩衝液中の抽出または再構成が含まれる。次いで、これらの上清の個々の成分の同定に焦点を合わせて研究がなされた。それは、例えば、Papermaster, B. ら、*Advances In Immunopharmacology*、507~511頁 (1981)；Dunn, P.A. ら、*J. Immunol. Methods* 64:71~83 (1983)；Papermaster, B.W. ら、*Cancer* 45:1248~1253 (1980) により記載されている。

【0004】今では多数のサイトカインが精製され、クローニングされ、組換え宿主中で発現されている。しかし、医学的な試行ではいくらかの成功がみられたが、有効用量では、多くの場合に毒性があるので、最も最近では、サイトカインのインヒビターの探索に焦点を合わせて努力がなされている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、サイトカインレベルの上昇に関連した障害の治疗方法および治療用組成物を、提供することである。

【0006】本発明がさらに目的とすることは、IL-6レベルの上昇に関連した障害の治疗方法および治疗方法を、提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】形質転換B細胞株は、制御された条件下で、ヒト血清培養培地中にIL-6のインヒビターを分泌する。この細胞培養培地、またはIL-6阻害活性を有するその精製画分は、IL-6レベル

の上昇により特徴づけられる障害、特に特定の型の癌、自己免疫障害、これらの障害に関連した痛み、化学療法から生じる副作用、および特定のウイルス性疾患の消耗(wasting) または他の症状を有する患者を治療するために投与され得る。好ましい細胞株は、アメリカンタイプカルチャーコレクションから得られるRPMI 1788であるが、他のB細胞株もまた、活性材料の源として用いられ得る。

【0008】本発明は、被験体への投与のための、造血細胞からサイトカイン含有組成物を調製する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：

- 新鮮培地上で該細胞を培養する工程；
- 該細胞培養上清を、該上清の濾過がない状態で採集する工程；および
- 該上清を投与まで維持する工程、

ここで、該維持上清は、投与用サイトカイン含有組成物である。

【0009】好ましい実施態様では、上記培養工程は、前記細胞によるサイトカインの産生の活性化をさらに包含する。

【0010】好ましい実施態様では、上記培養細胞は、免疫刺激細胞である。

【0011】好ましい実施態様では、本発明の方法は、上記培養細胞が癌関連ウイルスに予め曝されている方法である。

【0012】さらに好ましい実施態様では、上記ウイルスはエプスタインバーウイルスである。

【0013】好ましい実施態様では、上記上清は、約-40℃以下の温度に急速冷凍することにより維持される。

【0014】さらに好ましい実施態様では、上記冷凍上清が約3ヶ月未満維持される。

【0015】別の好ましい実施態様では、上記上清は、維持される間凍結乾燥されない。

【0016】別の好ましい実施態様では、上記上清は、緩衝液のない状態で維持される。

【0017】好ましい実施態様では、上記培地はヒト血清アルブミンである。

【0018】好ましい実施態様では、上記細胞はIgM分泌細胞である。

【0019】好ましい実施態様では、上記細胞は、RPMI 1788と称される細胞株であり、受諾番号CLL 166でアメリカンタイプカルチャーコレクションに寄託されている。

【0020】さらに本発明は、上記方法により製造されるサイトカイン含有組成物もまた提供する。

【0021】本発明は、IL-6の上昇により特徴づけられる障害を治療するための組成物を提供し、この組成物は、薬学的に受容可能なキャリアにおいて、IL-6レベルを減少させるに有効な量の組成物を含む。ここ

で、この組成物は、形質転換B細胞が免疫モジュレーターを分泌する滅菌培養培地またはIL-6阻害活性を有するその精製画分からなる。

【0022】好ましい実施態様では、上記組成物は、投薬量が、1日2回与えられる50mlの培養培地より少ない量に相当する。

【0023】好ましい実施態様では、上記障害は、IL-6レベルの上昇により特徴づけられる癌である。

【0024】好ましい実施態様では、上記障害は、自己免疫障害である。

【0025】好ましい実施態様では、上記障害は、化学療法剤での治療に起因する症状である。

【0026】好ましい実施態様では、上記障害は、癌または自己免疫障害と関連する痛みである。

【0027】好ましい実施態様では、上記障害は、以下を含む：多発性骨髄腫（mm）；前立腺癌；卵巣癌；キヤッスルマン病；カボージ肉腫（KS）；單一クローニ性高ガンマグロブリン血症；メサンギウム増殖性糸球体腎炎；慢性関節リウマチおよび他の関節炎（RA）；全身性紅斑性狼瘡（SLE）；多発性硬化症（MS）；重症筋無力症（MG）；ギヤンーバレー症候群（GBS）；トキシックショック症候群；細菌性およびウイルス性髄膜炎；HTLV-1-関連脊髄症（HAM）；アルツハイマー病；骨粗鬆症（破骨細胞疾患）；心臓性粘液腫および高カルシウム血症；アレルギー；分類不能型免疫不全；神経性食欲不振；炎症性腸疾患；臨界疾患多発神経性筋障害；急性腎孟腎炎；自己免疫肝炎；大細胞型リンパ腫；肺胞エキノコックス症；子宮内膜症；アテローム性動脈硬化症；乾癬；ヒトバルボウイルス感染；腎細胞癌；子かん前症；胆管癌；HIV；聽神経腫；毛様細胞性白血病；壊死性腸炎；潰瘍性大腸炎；気管支肺形成不全；精神分裂病および情動障害；網膜芽腫；脳下垂体腫瘍；急性腎孟腎炎；甲状腺癌；傍神経節腫；カンジダアルビカンス感染；巨細胞性動脈炎；乾癬；黒色腫；慢性肺臓炎；手根管症候群；間質性膀胱炎；神経膠星状細胞腫；呼吸性合胞体ウイルス感染；肝臓移植；アメニンジオマス；胃癌；類肉腫症；子宮癌；肺大細胞癌；ヘルコバクターピロリ感染；腺管胸部癌；巨細胞性動脈炎の肉芽腫；結腸直腸癌；臨床的絨毛羊膜炎；非ホジキンリンパ腫；甲状腺中毒症；骨肉腫；悪性中皮腫；腸チフス；IgA腎症；急性膀胱炎；ファンコニー貧血；腫瘍随伴性血小板増加症；および囊胞性纖維症。

【0028】好ましい実施態様では、上記組成物において、細胞株が、エプスタインバーウイルスまたはその一部での感染により形質転換される。

【0029】好ましい実施態様では、上記組成物において、細胞株が、受託番号CLL156でアメリカンタイプセルカルチャーに寄託されたRPMI1788である。

【0030】好ましい実施態様では、上記細胞培養培地

は、ヒト血清である。

【0031】好ましい実施態様では、上記細胞培養培地は、ヒトアルブミンである。

【0032】好ましい実施態様では、上記組成物は、分子量およびイオン交換クロマトグラフィーに基づいて精製される。

【0033】癌患者および自己免疫障害の治療効果について、実施例で説明する。

【0034】

10 【発明の実施の形態】

1. 薬学的組成物

本明細書で用いる「薬学的組成物」には、細胞分泌物含有組成物が含まれる。この組成物は、Bリンパ様細胞により產生され、エプスタインバーウイルスによる感染のような形質転換因子で誘発され、そしてヒトアルブミンまたは血清に基づく培養培地あるいは合成培地で培養され、細胞培養培地の遠心分離または濾過によりあるいは精製形で得られる。

【0035】（細胞）薬学的組成物を產生するために培

20 養され得る細胞は、主として造血細胞、特に、エプスタインバーウイルスにより形質転換されたヒトBリンパ様細胞株である。最も好ましい細胞株は、アメリカンタイプセルカルチャーコレクションに受託番号CLL156で寄託されているRPMI1788であり、これは、前もってエプスタインバーウイルスに曝されている。この細胞株は、ヒト人口の約60%がそうであるように、エプスタインバーウイルス核抗原ポジティブである。これらの細胞からの分泌物を含有する細胞培養培地は、本明細書では「LK-200」と呼ばれるが、1つの細胞株、ATCC CLL156のみからの分泌物が、一般に臨床的にテストされる。

【0036】用いられ得る他の細胞株は、IB4、RajiのようなEBV形質転換細胞株を含み、これは、Burkettリンパ腫細胞株、およびRjabのよう非EBV感染B細胞株である。これらの細胞株は、ATCCまたは他の入手先（例えばTufts New England Medical Center, Boston, Massachusetts）から入手され得る。

【0037】（誘発因子）細胞の形質転換のために用いられ得る試薬は、エプスタインバーウイルスのようなウ

40 イルスを含む。誘発因子は、ある場合は単独で、または形質転換因子と組み合わせて用いられ得るが、これには、腫瘍壞死因子（TNF）、内毒素、および当業者に公知の他の因子が含まれる。一般的に、培養細胞は、サイトカインの発現、免疫グロブリンの分泌、および/または細胞表面特性またはマーカーの増幅または改変のような他の指標により測定されるような、細胞の活性化に有効な量に曝される。ある場合では、細胞をまず少量に曝して細胞を「感作（prime）」し、次いで、次の用量に曝して細胞のより大きな活性化を誘起する。上記のように、これらの技術および材料は、文献中に公開されて

いる。この誘発因子は、培地を交換するときに、すなわち、細胞を少しづつ追加するか、または濾過するか、または遠心分離するかのいずれかで、続いてその培地をデカンテーションし、そして新鮮な培地と交換したときに、細胞培養培地から除去される。

【0038】(細胞培養培地) 細胞は、好ましくは、ヒト患者に直接投与され得る培地中で、培地に反応を誘起せずに培養される。好ましい実施態様では、培地は、例えば、Bio Whittaker, Inc., Walkersville, MD または Gibco, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY から入手の 2 % の A B ヒト血清に基づいているが、アルブミンが、細胞培養培地の採取直前に血清と置換され得る。ヒト血清は、2 % L-グルタミンの濃度で炭酸水素ナトリウム含有の Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) および 25 mM の HEPES に入れられる。この IMDM および L-グルタミンもまた、Bio Whittaker から入手され得る。

【0039】血清源は、最終生成物中のサイトカインレベルに影響を及ぼすが、それは比較的無視できる程度 (negligible) である。例えば、細胞除去後の Bio Whittaker 血清培地中の IL-8 のレベル (細胞除去方法にかかわらず、「上清」と呼ばれる) は、0.367 ± 0.17 ng IL-8 / ml と測定され、そして Gibco 血清培地中の IL-8 のレベルは、0.184 ± 0.1 ng IL-8 / ml と測定された; Bio Whittaker 血清培地中の TNF のレベルは、0.311 ± 0.24 ng TNF / ml であり、そして Gibco 血清培地中の TNF のレベルは、0.179 ± 0.07 ng TNF / ml であった。細胞はある程度まであるが、成長しそしてアルブミン中で活性成分を分泌する。

【0040】血清源の血液型が、異なる血液型を有する数人の患者中において反応を誘起し得ることが示された。従って、問題にするほどではないが、患者と同じ血液型の血清源を利用するが好ましい。

【0041】(培養条件) 細胞を、 1×10^6 細胞 / ml の最小密度に達するまで、37°Cでインキュベートする。採取時の pH は、約 7.00 ± 0.15 である。

【0042】例えば、ATCC から入手した RPMI 1788 細胞を、37°Cの水槽中で溶解し、そして 2 % のグルタミン、および 2 ~ 5 % の正常ヒト血清 (Gibco) または 10 ~ 25 % ヒトアルブミン (Gibco) を補足し

た 0.2 ミクロンのフィルターにかけた HEPES 含有 Iscov 培地 (GIBCO BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD から入手) に室温で懸濁する。細胞を 1×10^6 細胞 / ml を超える細胞密度に達するまで、T 75 フラスコ中で、5 % CO₂ 霧囲気下、37°Cで培養する。次いで、800 × g で 5 分間の遠心分離または濾過により、細胞を除去し得、そして T 150 フラスコ中の全容量が 200 ml の培地中に 0.2×10^6 細胞 / ml の密度で懸濁し得る。次いで、細胞を 1×10^6 細胞 / ml の密度に達するまで再度培養し、そしてこの工程を繰り返す。

【0043】次いで、細胞を、 0.2×10^6 細胞 / ml の初期細胞密度において、少なくとも 1×10^6 細胞 / ml の密度に達するまで、10 % CO₂ を流し、そして密封された 500 ml のローラーボトル中で培養し得る。

【0044】(細胞表面表現型およびサイトカインレベルの分析) RPMI 1788 (本明細書では LK 200 と呼ぶ) から生成される上清、および他の細胞株: IB4, Raji, Bjab、およびマイトジエン、PHA に曝すことにより活性化される末梢血球 (PBC)、およびコントロール: 細胞に曝されていない 2 % ヒト血清培地、細胞に曝されていない 10 % ウシ胎児血清 (FCS) 培地、および T 細胞株 OKT 3 の上清。結果を表 1 ~ 3 に示す。表 1 は、RPMI 1788 が 1 週間だけ L 鎖を発現することを示す。「ATCC」とラベルされた RPMI 1788 細胞 (この株を最初に購入したときからインビトロではおそらく増殖しない) は、この抗原について著しくポジティブである。理由はまだ知られていないが、RPMI 1788 株は、他の株で見出される「純型の (naive)」CD 45 イソ型を発現しない。

しかし、この株は、Becton Dickinson HLe-1 mAb と反応性である。CD 45 の代替スプライス変異体における専門家である Michel Streuli 博士 (DFCI, Boston) によれば、この株は、Bのみ、または B および C エキソンによりコードされる物質を含有するイソ型を発現する。このイソ型の構造に關係なく、変異体の重要性ははっきりしない。

【0045】

40 【表 1】

表面発現型

マーカー	細胞株			
	RPMI 1788	IB4	Raji	Bjab
mAb				
CD3	—	—	—	—
CD5	—	—	—	—
CD19	+	+	+	+
CD20	+	+	+	+
CD21	39%	+	+	+
HLA-DR	+	+	+	+
κ	—	—	81%	—
λ	5/82	+	—	—
CD45	+	+	+	+
(HL-E-1)	—	—	—	—
CD45RA	—	+	+	53%
(Leu-18)	—	—	—	—
CD45RO	—	—	—	—
(UCHL-1)	—	—	—	—

【0046】(+)および(−)の印は、それぞれ100%および0%の発現を示す。RPMI 1788およびIB4細胞株は、EBV+LCLである。Rajiは、Burkittリンパ腫であり、そして、Bjabは非EBV感染B細胞株である。これらのFACS分析で用いられる全てのmAbは、抗CD21を除いてFITC*

*複合抗体であった。非複合抗CD21 mAbは、CD21表面発現を検出するために、抗ネズミIgG-FITC二次抗体と共に用いられた。

【0047】

【表2】

	上清	サイトカインレベル (pg/ml)			
		IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6
培地	2% AB 血清	80	0	0	20
培地	10% FCS	80	0	0	92
PHA- 活性化 PBMC	1,003	1,602	13	4,705	
IB4	80	0	0	20	
Raji	80	0	0	20	
Bjab	80	0	0	20	
RPMI 1788 (ATCCから入手)	80	0	0	94	
RPMI 1788 (2/16冷凍で入手)	80	0	0	94	
LK200 (Woburnから入手) 4/23	80	0	0	20	
LK200 (Woburnから入手, 1/8)	80	ND	ND	20	
LK200 (Woburnから入手, 1/10)	80	ND	ND	20	

【0048】* IL-1 β 、TNF、IL-6、IL-10、IL-1RA、可溶性IL-1レセプタータイプII(sIL-1RII)、およびIL-8は、RIAによりアッセイした。IL-2、IL-4、GM-CSF、およびIFN- γ は、Endogenから入手のキットを

用いてELISAによりアッセイした。IL-12は、R&D Systemsから入手のキットを用いて同様にアッセイした。

【0049】

【表3】

サイトカインレベル
(pg/ml)

	上清	IL-8	IL-10	IL-12	IFN- γ
培地 2% AB 血清		34	20	0	0
培地 10% FCS		41	29	0	0
PHA-活性化 PBMC		22,640	1,436	0	865
IB4		30	20	0	0
Raji		30	22	0	0
Bjab		36	920	0	0
RPMI 1788 (ATCCから入手)		135	20	0	0
RPMI 1788 (2/16冷凍で入手)		34	20	0	0
LK200 (Woburnから入手) 4/23		30	20	0	0
LK200 (Woburnから入手, 1/8)		96	20	ND	ND
LK200 (Woburnから入手, 1/10)		83	27	ND	ND

【0050】* >標準曲線の生成に用いられる最高濃度。

* 【0051】

* 【表4】

サイトカインレベル
(pg/ml)

	上清	IL-1RA	TNF	GM-CSF	sIL-1RII
培地 2% AB 血清		107	41	0	432
培地 10% FCS		93	83	0	164
PHA-活性化 PBMC		8,516	2,181	190	528
IB4		48	178	0	1,100
Raji		86	98	0	212
Bjab		227	113	0	148
RPMI 1788 (ATCCから入手)		86	191	0	404
RPMI 1788 (2/16冷凍で入手)		141	118	0	296
LK200 (Woburnから入手) 4/23		61	175	0	304
LK200 (Woburnから入手, 1/8)		137	225	ND	236
LK200 (Woburnから入手, 1/10)		49	252	ND	352

【0052】表2、表3、および表4に示す結果は、LK200およびRPMI 1788上清が適度な量のIL-8 (135 pg/ml未満で不变) および適度な量のTNF (250 pg/ml未満) を含有することを説明している。Bjab株由来の上清は、多量のIL-10 (920 pg/ml) を含有する。これは、EBV非感

染性の研究された1つのB細胞株である。IB4株は、タイプII IL-1レセプター (1,100 pg/ml) を放つ (shed)。Bjab株は、適度な量 (227 pg/ml) のIL-1RAを分泌する。

【0053】

【表5】

PBMC中のサイトカイン誘発因子*

レベル (pg/ml)

誘発因子	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6
培地 2% AB 血清	143	0	0	3,475
PHA	1,003	1,602	13	4,705
LK200 (Woburnから入手)1:3+	80	0	0	2,368
LK200 1:6+	80	0	0	1,147
RPMI 1788 (ATCCから入手)上清1:3+	80	0	0	925
RPMI 1788 (ATCCから入手)上清1:6+	80	0	0	483
OKT3 (0.1 μ g/ml)	102	0	0	2,852
OKT3 + LK200 (Woburnから入手)1:3+	80	0	0	2,722
OKT3 + LK200 1:6+	1,032	0	0	4,004

【0054】*この実験(5/9/95)へのPBMCの提供者は、Damien Sorceであった。テストされた各条件について、12.5 × 10⁶個の細胞を、予めヒトアルブミンでコートした50mlのポリプロピレン製遠心管中で、5mlの全容量中でインキュベートした(10 μ g/ml × 1時間)。細胞を、2%のヒトAB血清および4 μ g/mlのポリミキシンBを補足したRPMI培地中で培養した。37°Cで48時間後、分泌されたサイトカインを培養培地全体に確実に平衡化するために、PBMCを短時間ボルテックスにかけ、次いで、遠心分離によりペレットにした。上清を将来分析するために、*

*滅菌条件下で取り出し、そして冷凍した。IL-1 β 、TNF、IL-6、IL-10、IL-1RA、可溶性IL-1レセプタータイプII(sIL-1RII)、およびIL-8は、RIAによりアッセイした。IL-2、IL-4、GM-CSF、およびIFN- γ は、Endogenから入手のキットを用いてELISAによりアッセイした。IL-12を、R&D Systemsから入手のキットを用いて同様にアッセイした。

* 培養培地の最終希釈を言う。

【0055】

【表6】

PBMC中のサイトカイン誘発因子*

レベル (pg/ml)

誘発因子	IL-8	IL-10	IL-12	IFN- γ
培地 2% AB 血清	22,830	45	0	5
PHA	22,640	1,436	0	865**
LK200 (Woburnから入手)1:3+	25,140	38	0	6
LK200 1:6+	25,980	32	0	0
RPMI 1788 (ATCCから入手)上清1:3+	16,640	49	0	0
RPMI 1788 (ATCCから入手)上清1:6+	13,270	37	0	0
OKT3 (0.1 μ g/ml)	18,180	543	0	461
OKT3 + LK200 (Woburnから入手)1:3+	16,320	561	0	256
OKT3 + LK200 1:6+	28,970	1,013	0	587**

【0056】* 培養培地の最終希釈を言う。

** >標準曲線の生成に用いられる最高濃度。

【0057】

【表7】

PBMC中のサイトカイン誘発因子*

レベル (pg/ml)

誘発因子	IL-1RA	TNF	GM-CSF	sIL-1RII
培地 2% AB 血清	4,165	292	0	488
PHA	8,516	2,181	190	528
LK200 (Woburnから入手)1:3+	2,372	223	0	316
LK200 1:6+	2,906	159	0	356
RPMI 1788 (ATCCから入手)上清1:3+	6,277	198	0	365
RPMI 1788 (ATCCから入手)上清1:6+	4,811	154	0	344
OKT3 (0.1 µg/ml)	6,328	541	2	524
OKT3 + LK200 (Woburnから入手)1:3+	7,755	651	2	668
OKT3 + LK200 1:6+	4,545	1,375	19	524

【0058】表5、表6、および表7に示されるように、種々のLK200調製物のみでは、任意のサイトカインの適切な量を産生するPBMCを誘発しなかったが、抗TcR mAb OKT3の低濃度での誘発効果を強めた。特に、これらの調製物は、IL-1 β の産生を増強した。これは、OKT3のみで誘発される産生の10倍以上であった。TNF産生は、250%増加し、そしてIL-8の産生は50%増加した。IL-10の産生は2倍であった。OKT3だけでは2pg/mlのGM-CSFの産生が、OKT3+LK200 (1:6希釈)では19pg/mlに増加した。

【0059】LK200自体の生成に用いられる2%のヒトAB血清は、おそらくFcRシグナルにより、多量のIL-6、IL-8、およびIL-1RAを誘発する。LK200およびRPMI1788の上清は、この効果を著しく抑制する。特にIL-6の生成は、80%より大きく減少された。IL-8の生成は、約40%減少した。

【0060】これらの結果は、この組成物が、インヒビターとしてのみ作用するのではなく、おそらく阻害またはこの組成物の他の成分との競争的相互作用の結果として、より低濃度に希釈された場合にさらに有効であることを示す。

【0061】(薬学的に受容可能なキャリア)薬学的組成物は、培養培地のみから成り得るか、あるいは脱イオン水または通常の生理食塩水(0.15N NaCl)または他の生理学的緩衝液で希釈され得る。pHを変えないように注意しなければならない。培地は、患者に投与する直前まで希釈すべきではない。

【0062】(細胞培養培地の処理)好ましい実施態様では、細胞は培養培地から取り出され、生物学的に有効な分子を含む上清が得られる。細胞は、遠心分離または濾過により取り出され得る。代表的には、この培地は、デカンテーション、ピベッティング、濾過、または遠心分離により、ローラーボトルから回収され、次いで、この培地を滅菌シリンジ中に入れる。この物質は、分子量

による分離、イオン交換樹脂上のクロマトグラフィー、および当業者に公知の他の方法に基づいてさらに処理され得、ここで、その活性画分は、IL-6活性の阻害により定義される。

【0063】(滅菌)標準的な滅菌条件下で細胞を培養し、無菌条件下で細胞培養培地を取り出すことにより、確実に無菌状態にされ得る。あるいは、この細胞培養培地は、250,000ダルトン未満の分子、より好ましくは150,000ダルトン未満の分子を排除しない、例えば0.25ミクロンフィルターを用いて、濾過することにより精製され得る。

【0064】(保存)上清は、37℃の温度で10%の窒素雰囲気の細胞培養ボトルから、一旦取り出され、そして細胞から分離されると、室温で少なくとも2~4時間はいかなる活性も喪失せずに維持され得る。長期間保存するためには、培地を液体窒素中、ドライアイス上、またはウルトラフリーザー中で、約-40℃~-80℃の温度で、すばやく冷凍しなければならない。

【0065】(薬学的組成物の分析)45組のLK-200を種々のサイトカインについてアッセイし、表2に示すように、濃度を1ミリリットル範囲当たりのナノグラムの範囲で示す。全ての組は、バッチ毎で本質的な変化を示さなかった。サイトカインのレベルと培地中のヒト血清濃度との間には、何らかの直接的な関係がある。上清中の内毒素レベルは、一貫して10pg内毒素/ml以下で測定される。一般的に、10ngまでのレベルであれば、患者へ投与可能である。

【0066】II. 治療方法

(治療され得る障害)インターロイキン-6(IL-6)は、広い系列の異なる細胞型に影響を与える多能性のサイトカインである。それは、一般的にB細胞成長因子として認識され、最初は、エプスタインバーウィルス(EBV)で形質転換されたCESSリンパ芽球様株内での免疫グロブリン分泌の誘発因子として同定された。これは、急性期(acute phase)タンパク質として分類されるが、その役割は多くの様相を呈し、そして依然と

していく分不明瞭である。明らかに、これは、いくつかの病変に深く関わっていると考えられている重要なサイトカインである。

【0067】IL-6に対するレセプターはgp130である。これは、膜貫通性の導入レセプターであり、細胞膜にわたって位置し、一旦リガンドが結合すると細胞にシグナルを送る。gp130レセプターをIL-6と共有する他のサイトカインが存在する（白血球阻害因子（LIF）、オンコスタチン（oncostatin）M（OSM）、IL-11、および毛様体神経親和性因子（CNTF）を包含する）。

【0068】IL-6のインヒビターは、レチノイン酸および数種のステロイド（デキサメタゾン）である。可溶性のgp130は、一時IL-6活性に対して阻害性であるとみなされていた。しかし、IL-6と可溶性gp130との結合は、病的影響を再燃させ、特に破骨細胞形成を再燃させる。数種の疾患において、例えば、多発性骨髄腫およびカポージ肉腫では、IL-6は、オートクライインまたはパラクリンの役割を演ずると考えられている。これらの場合には、IL-6がどちらでも産生され、次いで同じまたは近接している細胞により用いられて、疾患を永続させる。

【0069】IL-6が関連する病理学は、以下を含む：多発性骨髄腫（mm）；前立腺癌；卵巣癌；キャッスルマン病；カポージ肉腫（KS）；単一クローン性高ガンマグロブリン血症；メサンギウム増殖性糸球体腎炎；慢性関節リウマチおよび他の関節炎（RA）；全身性紅斑性狼瘡（SLE）；多発性硬化症（MS）；重症筋無力症（MG）；ギヤンーバレー症候群（GBS）；トキシックショック症候群；細菌性およびウイルス性髄膜炎；HTLV-1-関連脊髄症（HAM）；アルツハイマー病；骨粗鬆症（破骨細胞疾患）；心臓性粘液腫および高カルシウム血症。IL-6が関連し得るさらなる病理学は、以下を含む：アレルギー；分類不能型免疫不全；神経性食欲不振；炎症性腸疾患；臨界疾患多発神経性筋障害（Critical illness polyneuromyopathy）；急性腎盂腎炎；自己免疫肝炎；大細胞型リンパ腫；肺胞エキノコックス症；子宮内膜症；アテローム性動脈硬化症；乾癬；ヒトパルボウイルス感染；腎細胞癌；子宮前症；胆管癌；HIV；聴神経腫；毛様細胞性白血病；壞死性腸炎；潰瘍性大腸炎；気管支肺形成不全；精神分裂病および情動障害；網膜芽腫；脳下垂体腫瘍；急性腎盂腎炎；甲状腺癌；傍神経節腫；カンジダアルビカンス感染；巨細胞性動脈炎；乾癬；黑色腫；慢性脾臓炎；手根管症候群；間質性膀胱炎；神経膠星状細胞腫；呼吸性合胞体ウイルス感染；肝臓移植；アメニンジオマス（Ameningiomas）；胃癌；類肉腫症；子宮癌；肺大細胞癌；ヘルコバクターピロリ感染；腺管胸部癌；巨細胞性動脈炎の肉芽腫；結腸直腸癌；臨床的絨毛羊膜炎；非ホジキンリンパ腫；甲状腺中毒症；骨肉腫；悪性中皮腫；腸チ

フス；IgA腎症；急性膀胱炎；ファンコニ貧血；腫瘍随伴性血小板増加症；および囊胞性纖維症。

【0070】（投薬量および投与スケジュール）投薬量および投与スケジュールは、非常に個人的であり、臨床的症状の緩和（例えば、腫瘍体積の減少、骨の痛みの消失、および他の主観的または客観的基準）に応じて、個人個人で最適化される。

【0071】（癌およびウイルス性疾患）癌またはウイルス性感染症の治療において、多数の異なる基準が効果の徴候として用いられる。例えば、腫瘍の大きさは、当業者に公知であるCATスキャニング（コンピュータ化身体中心部断層撮影法）、MRI（磁気共鳴画像法）、および核医学スキャンのような標準腫瘍検出測定法によりモニターされ得る。ウイルスまたは疾患の全体の解剖学的関係により引き起こされる病巣の進行およびかかわり合い（それは、本明細書では疾患を進行させる指標として用いられているが）は、特定の疾患に依存する特定の病巣型のそれぞれについて、当該分野で公知の標準的な方法により決定され得る（例えば、器官機能または抗体力値）。ウイルス性の感染症の治療について、効果は、本発明により減少される症状の度合いおよび持続性として測定され得る。これには、減少される病理学的および病態生理学的活性の測定、例えば、肝臓機能の上昇、ビリルビンレベルの上昇、肝臓の大きさの肥大、および脾臓の肥大が含まれ得る。

【0072】（化学療法における痛みおよび副作用の減少）この組成物はまた、化学療法および放射線療法の副作用を減少するのに有効である。減少され得る副作用には、恶心、嘔吐、および抜け毛が含まれる。痛みもまた、多くの場合に減少される。痛みの緩和には、腫瘍の大きさまたは病巣の占める空間の減少、従って、器官圧および解剖学的構造物（すなわち、神経、血管、および他の器官）の圧縮の減少による痛みの緩和、および腫瘍の大きさの減少または病巣の減少に関わらない痛みの緩和（例えば、骨の痛みおよび腫瘍の大きさが著しく減少する前に生じるかまたは病巣が生じるときの他の痛みの緩和）が含まれる。

【0073】（自己免疫障害の治療）自己免疫は、自己成分に対して備えられた（mount）免疫応答として記載され、これは、最終的に病原性結果に至る。自己免疫応答から生じる疾患は、臨床的に広くそして変化して現れる。これらの疾患全体の多くに共通する共通因子の1つは、病因学的因子、またはこれらの異常応答の生成を誘引する事象が知られていないことである。リウマチ学的病気には、多数のそしてスペクトルが広い種々の自己免疫疾患が含まれ、それは例えば、慢性関節リウマチ、強皮症、皮膚筋炎、多発性筋炎、円板状紅斑性狼瘡、シェーグレン症候群、および全身性紅斑性狼瘡である。この大部分に関しては、これらの障害の病因学的および病原機構は、依然未知である。これらの疾患における多くの

40 され、これは、最終的に病原性結果に至る。自己免疫応答から生じる疾患は、臨床的に広くそして変化して現れる。これらの疾患全体の多くに共通する共通因子の1つは、病因学的因子、またはこれらの異常応答の生成を誘引する事象が知られていないことである。リウマチ学的病気には、多数のそしてスペクトルが広い種々の自己免疫疾患が含まれ、それは例えば、慢性関節リウマチ、強皮症、皮膚筋炎、多発性筋炎、円板状紅斑性狼瘡、シェーグレン症候群、および全身性紅斑性狼瘡である。この大部分に関しては、これらの障害の病因学的および病原機構は、依然未知である。これらの疾患における多くの

50

共通の主題は、自己成分に対して免疫活性である相当な量の抗体が存在することである。このようなりウマチ病の1例は、全身性紅斑性狼瘡である。これらの多くの患者に共通する特徴は、彼らの血清中に高力価の自己抗体が存在することである。これらの自己抗体は、無数の宿主成分（例えば、リボヌクレオタンパク質（S m、n R N P、R o、およびL a）、DNA、RNA、ヒストン、赤血球、および免疫グロブリン、および他の特徴づけられているかまたは特徴づけられていない自己抗原）に対して指向的であり得る。重症筋無力症は、病因学的に未知の疾患であり、アセチルコリンレセプターに対する抗体が循環することにより特徴づけられる。この疾患は、眼および他の頭部の筋肉に偏った筋肉の衰弱により示される。それは、重篤度に揺動する傾向がある。神経学的病巣の徵候はない。この疾患は、免疫学的原理を有すると考えられており、アセチルコリンレセプターに結合する抗コリン性抗体が、疾患を患っている患者のほとんどに見出される。患者はまた、抗筋肉抗体を与え得る。抗コリン性抗体は、多数の機能的なアセチルコリンレセプターを有効に減少する。レセプターに対する細胞の免疫活性が見出されたとも考えられている。患者は、揺動し得る全身性衰弱を呈し、最も一般的には随意筋を動かすことに関して衰弱を呈する。複視、下垂症、および失語症のような症状が、注目される。活性は、罹患した筋肉の衰弱を増大させる。効果が、自己抗体レベルの減少により示される場合もあり、症状の重篤度が減少することにより示される場合もある。例えば、効果は、大筋肉および近位筋肉機能障害における回復、抗アセチルコリン活性の減少、抗平滑筋抗体レベルの減少、および嚥下機能障害および失語症の回復により示され得る。

【0074】（投薬量）LK-200の一般的な投与方法および用量スケジュールは、以下の通りである。冷凍LK-200を、過剰に加熱せずに、または機械的に攪拌することなく、2時間以内で溶解する。次いで、50ccのLK-200を50～100ccの通常の生理食塩水と混合する。ある場合には、疾患または応答に応じて、100～200ccのLK-200が、50～100ccの通常の滅菌生理食塩水と混合され得る。一般的に、50～100ccの通常の滅菌生理食塩水と混合した50ccを、最初の10～14日間の間1日1回投与し、次いで、1週間に3回のスケジュールで投与する。状況によれば、50～100ccの通常の滅菌生理食塩水と混合した200ccまでのLK-200が、1日4回投与される。この混合物は、投与すべき全容量に依存して、5～45分間かけて静脈内に注入される。患者に心臓代償不全のおそれがある場合には、さらに遅い速度にするときがある。

【0075】表5～7のデータおよび予備の臨床データにより示されるように、1週間当たり3～5回投与され

る細胞培養上清の投薬量を、50mlから10または25mlに低下することにより、効果が増強されており、組成物においてIL-6のインヒビターの負の用量依存性（negative dose dependency）がある。

【0076】静脈内投与は、通常の静脈内注射により末梢静脈から行われ得る。ある場合には、患者は、Hiemanカテーテルのような注入用に用いられる専用の導入口を有する。これは、化学療法および/または栄養過給あるいはこれらのカテーテルの使用を受容する他の用途に用いられる特定の鎖骨下経由カテーテルを含む。LK-200はまた、選択的に直接動脈内に注入することによるか、または腹腔内注入により投与され得る。ある場合には、携帯型注入ポンプが好ましい。

【0077】投薬量は、1日当たり1回から4回まで変えられ得るか、あるいは隔日、または1週間に2回または3回まで減少され得る。代表的な投薬量は、0.1cc/日と100cc/日との間に等しく、平均して約10～50ccが、1日1回または2回あるいは隔日で投与される。

【0078】当然ながら、上記で提供された投薬量は、細胞培養培地の投与に基づいている。従って、精製画分を用いる場合には、投薬量は適宜に調節される。

【0079】本発明は、以下の限定していない実施例を参考とすることにより、さらに理解される。

【0080】

【実施例】

実施例1：癌患者の治療

1日目～7日目：100mlの通常の食塩水中の1日1回の用量の10～50mlのLK200を、15～30分間かけて静脈内に投与した。

【0081】8日目以後：10～50mlのLK200を、1週間に2～3回投与した。

【0082】腫瘍応答が十分でない場合は、1回当たりの投薬量を増やすよりはむしろ1日当たりの投薬回数を増やすことにより、任意の投薬量の増加がより良く達成されることが見出された。投薬を追加しても、有害な作用は観察されなかった。

【0083】（患者の状態）LK200の最初の用量を投与すると、患者は即座に以下の効果、すなわち、約24～48時間以内に、表8に詳細に記した腫瘍が即座に縮小するのに加えて、痛みの緩和；食欲増進；体力の増加、体力消耗の停止；良質の睡眠の増加を経験した。

【0084】LK200で治療した患者からのデータを、表8に掲載する。ここでは、表に挙げた疾患と関連した特定の腫瘍または病巣の軽減を詳細に述べている。腫瘍および病巣は、CATスキャン、MRI、および目視検査により測定した。

【0085】

【表8】

癌患者の治療効果

患者	癌のタイプ	期間	軽減
A 1 0 1	非ホジキンリンパ腫	8 週間	6 8 %
A 1 0 2	非ホジキンリンパ腫	4 週間	3 0 %
A 1 0 3	中皮腫、転移性	1 週間	1 2 %
A 1 0 4	脳の扁平上皮癌	3 週間	2 8 %
A 1 0 5	精巣の胎生期癌	3 週間	3 6 %
A 1 0 6	右胸部癌	6 週間	3 5 %
A 1 0 7	胸部S/P癌 乳房切断；骨転移	(新規)	
A 1 0 8	カルチノイド、転移性	8 週間	3 5 % 現在囊胞性癌
A 1 0 9	悪性黒色腫 脳の小脳 大脳	8 週間 8 週間	7 8 % 壊死性癌 5 2 % 壊死性癌
A 1 1 0	卵巣癌	3 週間	3 5 % 概算
A 1 1 1	卵巣癌	2 週間	4 0 % 現在手術可能
A 1 1 2	悪性黒色腫-転移(肝臓) 骨および肝臓(骨)へ	2 週間	5 0 % 骨の痛みなし
V 1 0 1	活動性慢性肝炎	8 週間	4 0 %
V 1 0 2	肺のCA	2 週間	未決定
V 1 0 3	乾癬	1 週間	1 0 % 概算
V 1 0 4	咽頭-S/PのCA 咽頭切除； 頭蓋下の転移性疾患	4 週間	2 5 % (消散)
V 1 0 5	カボージ肉腫	8 週間	1 0 0 %
R 1 0 1	カボージ肉腫(HIV免疫無防備 状態)	8 週間	6 0 %

【0086】患者のデータを以下に付記する。

【0087】

患者A 1 1 2 (骨および肝臓への転移性の悪性黒色腫)

治療前： 骨および肝臓の広範囲の疾患

骨に激しい痛み

治療の速効： 痛みがない

標準的治療 機能、アルカリホスファターゼおよびBUNが劇的に上昇し

の1週間後： た；クレアチニンは本質的に正常なままであった；胸骨の病
巣が60% (概算) 消散した；肝臓の約50%の障害がなく
なった。

【0088】

分析の結果： 家族が治療を止めることを決定した。患者は、腫瘍壊死症候
群と考えられていた。家族の決定により、透析は試みられな
かった。

【0089】

患者V 1 0 1 (活動性慢性肝炎) :

1993年4月治療開始

治療前： ピリルビン6.7

(1993年4月) 肝機能：上昇 40
黄疸患者

1993年6月1日 ピリルビン4.5

肝機能：正常

無黄疸性患者

肝臓：10%大きさが減少

脾臓：25~30%大きさが減少。

【0090】

患者V 1 0 3 (乾癬) :

治療に対する 不快感が緩やかに減少；赤くそして硬くなった斑が減少した

初期応答 ；手掌 (palmer) 病巣が消滅した；患者は数日間コルチゾン

の治療を停止し得、そして現在は本来の用量の25%を用いている。

【0091】

患者V105（カポージ肉腫）：

治療の1ヶ月後、最大の病巣が消滅し、そして依然存在する4つの付隨病巣は30%軽減した。1ヶ月後に治療を停止した。全ての病巣が消滅した。

【0092】

患者R101（カポージ肉腫）：

以前の記録： HIVによる免疫無防備状態の男性； CD4は25未満；以前の治療は、1年間、1週間に3回インターフェロンを投与多数の病巣に軽減はみられなかった。

【0093】

標準的治療の
8週間後： 大きな病巣が40～50%に減少した；いくつかの平坦な皮膚病巣が60%軽減した。

【0094】実施例2：乾癬を患う患者の治療

乾癬ケラチノサイト（keratinocyte）（皮膚細胞）は、IL-6を產生し、IL-6に応答する（Grossman, R.ら、「Interleukin-6 is expressed in high levels in Psoriatic Skin and Stimulates Proliferation of Cultured Keratinocytes.」*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 6367, 1989; Bergui, L., 「Interleukin-3 and Interleukin-6 Synergistically Promote the Proliferation of Malignant Plasma Cell Precursors in Multiple Myeloma.」*J. Exper. Med.* 170: 613, 1989）。以下に示すように、LK-200を乾癬を患う患者に投与すると、状態の消散を示した。IL-6产生および／または作用の中止により、これらの観察結果が説明され得た。

【0095】1日当たり20グラムのヒドロコルチゾンを局所的に摂取している、重度の乾癬患者において、上記のようにLK-200処置を開始した。ヒドロコルチゾンは多数の望ましくない副作用を有するので、この投薬量を減少すること、および治療の効果を上げることが非常に望ましかった。

【0096】4週間後、患者は、1日当たり5グラムのみのヒドロコルチゾンを用いると、乾癬の約30%が消散した。

【0097】悪性の骨髄腫に関連した乾癬を患う2人の患者を、LK-200で処置した。乾癬は、従来の医学的治療に非応答性であった。

【0098】4週間にわたって、患者のIgGレベルは、21g m%～15g m%であった。乾癬は、最初の2週間または3週間で50%消散した。患者は、骨の痛みが著しく減少した。患者は、麻酔薬および他の強力な無痛法を用いることを停止した。

【0099】実施例3：慢性関節リウマチを患う患者の治療

LK-200は、炎症性サイトカインの产生を抑制する。順次に得られたAIDS消耗症候群を患う患者の赤血球沈降率（ESR）は、LK-200での治療開始後

20

に劇的に下がった。LK-200処置を施している他の患者における沈降率もまた、腫瘍または潜在的免疫疾患のタイプに関係なく劇的に下がった。沈降率（ESR）は、進行中の炎症性障害の重篤度のおおざっぱな指針である。それは、フィブリノーゲン、つまり、肝臓中で生成される凝結タンパク質の血漿レベルにより主として決定される。フィブリノーゲンの生成は、IL-6により調節される。従って、IL-6生成の抑制またはその生物学的効果の妨害により、ESRは急激に低下し得る。

【0100】これらの結果を考慮して、あらゆる種の従来の治療（金治療（gold treatment）およびメトトレキサート治療を含む）で治らなかった重篤な慢性関節リウマチを患う中年女性を、LK-200で治療した。患者は、治療開始時には、沈降率60であった。LK-200を2週間投与した。

【0101】治療の2週間後、患者の沈降率は、15～20付近の正常値にほぼ戻った。彼女は、手に痛みをさらに感じることはなく、そして彼女は家事を再開し得た。

【0102】実施例4：重症筋無力症を患う女性患者の治療

患者：患者は、13歳の白人女性で、重症筋無力症であるとの診断が確定している。彼女は、極端に衰弱した状態で、車椅子に座り、自分の手を挙げることができず、そして自分の大末梢筋肉群のいずれをも容易に動かし得なかった。彼女は、眼球麻痺についてのヘス試験で、強い陽性であった。彼女は極度の下垂症であり、中程度の複視であった。この患者は、治療開始前に325ccのピーク流を示した。彼女は、日中は2時間毎に60ミリグラムずつ、就寝時には180ミリグラムのメスチノン投与を維持した。

【0103】（方法）：滅菌解凍したLK-200を、20～45分間にわたって患者に静脈内投与した。50ccのLK-200を50ccの通常の滅菌生理食塩水に混合し、そして末梢静脈注射による注入のために調製した。IV溶液を、月曜日から金曜日まで2週間の間、

40

50

毎日患者に投与した。

【0104】最初の2週間に、患者は末梢筋肉の強度に緩やかな回復がみられ、そして眼の下垂症がわずかに減少した。複視は幾分良好になった。さらに、彼女の起きている間のメスチノン投薬量は、2時間毎に60ミリグラムから時々30ミリグラムまで2時間毎に減少し得た。これは散在性であった。

【0105】パルス治療は、重症筋無力症の治療に用いられる治療に有効な場合があるので、彼女の養生法を変えて、50ccの通常の生理食塩水中で100ccのLK-200を30分以上かけて隔日に彼女に与えることに決めた。7日以内に患者は著しい応答を見せた。彼女はもはや昼寝を取らず、彼女の筋肉は強さを増し、彼女の複視は完全に消散し、そして彼女は車椅子から立ち上がり補助なしで歩くことができた。メスチノン投薬量は、2時間毎に30ミリグラムまで減少し得、そして時々控えた。ピーク流は、初め325ccから220ccまで下がった。次の3~4週間にわたって、ピーク流は確実に上昇し、現在では350~400ccを超えている。患者は今では介護なしで歩行し、彼女のヘス試験は完全に陰性であり、そして初期に観察された筋肉の衰弱

は消散した。彼女は、治療を始めて6週間目まで、安定して回復し続けた。次いで、LK-200の用量を、月曜日、水曜日、および金曜日に100ccまで減少した。

【0106】アセチルコリン抗体および抗平滑筋抗体の測定により、さらに効果が示される。LK-200で10日間治療した後、アセチルコリンレセプター抗体のレベルは、3.9nmol/Lであった。さらに1ヶ月治療した後、レベルは3.0nmol/Lまで減少した。

【0107】本発明の方法の改変法および変形法は、上述の詳細な説明から当業者に明らかである。このような改変法および変形法は、請求の範囲となるように意図されている。

【0108】

【発明の効果】従って、本発明により、サイトカインレベルの上昇に関連した障害の治療用組成物、その製造方法、およびその治療方法が得られた。さらに、本発明により、IL-6レベルの上昇に関連した障害の治療用組成物、その製造方法、およびその治療方法もまた得られた。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	A B J		A 6 1 K 37/02	A B D
	A B X			A B F
	A C J			A B G
	A C V			A B J
	A D A			A B X
	A D V			A C J
35/12	A C V			A C V
C 0 7 K 14/52				A D A
C 1 2 N 5/10				A D V
C 1 2 P 21/00		9281-4B	C 1 2 N 5/00	B
//(C 1 2 N 5/10				
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 P 21/00				
C 1 2 R 1:91)				

(71)出願人 595103946

3400 Peachtree Road
N. E., Suite 811, Atlanta, Georgia 30326, United States of America